

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 808 804

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

00 05852

⑤① Int Cl⁷ : C 12 Q 1/02 // C 12 N 15/86, C 12 Q 1/70 (C 12 Q 1/
02, C 12 R 1:91)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 09.05.00.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : NAUTILUS BIOTECH Société à res-
ponsabilité limitée — FR.

⑦② Inventeur(s) : VEGA MANUEL

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.11.01 Bulletin 01/46.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ PROCÉDE DE DETERMINATION DU TITRE D'AGENTS BIOLOGIQUES EN TEMPS REEL DANS DES
CELLULES CIBLES VIVANTES ET SES APPLICATIONS.

⑤⑦ Procédé de détermination du titre (concentration)
d'agents biologiques, tels que des vecteurs viraux de trans-
fert de gènes, en temps réel, dans des cellules cibles vivan-
tes et ses applications dans le domaine de la thérapie
génique et du diagnostic.

FR 2 808 804 - A1



L'invention est relative à un procédé de détermination du titre (concentration) d'agents biologiques, tels que des vecteurs viraux de transfert de gènes, en temps réel, dans des cellules cibles vivantes, ainsi qu'à ses applications (thérapie génique, génomique fonctionnelle, diagnostic viral, vaccins, protéines recombinautes).

Dans l'exposé de la présente invention on définit par :

- agent biologique : un vecteur de transfert de gènes viral ou non-viral, un virus, un anticorps, un vaccin viral ou non-viral ou une protéine recombinante,
- 10 • titre d'un agent biologique : sa concentration en particules (virus, vecteur de transfert de gène viral, vaccin viral) ou en molécules (protéine recombinante, anticorps),
- cellules cibles vivante : des cellules cibles, *in vitro* ou *ex vivo*, avant leur modification par un agent biologique,
- 15 • mesure en temps réel : une mesure dont la valeur est obtenue instantanément.

Les progrès relatifs aux transferts de gènes en thérapie génique dépendent d'une part de la capacité à développer et à produire des vecteurs permettant, dans la cellule cible, une expression régulée d'une protéine ou d'un ARN qui possèdent des effets thérapeutiques et d'autre part de la capacité à identifier de nouveaux gènes thérapeutiques.

Ainsi, avec le développement récent du domaine de la génomique fonctionnelle, les vecteurs initialement développés pour le transfert de gènes, sont aussi utilisés comme outils pour le criblage des banques de gènes.

25 Ces progrès impliquent :

- la construction et le criblage de banques de vecteurs de transfert de gènes,
- le développement de constructions de vecteurs optimisées, parfaitement adaptés à chaque application thérapeutique, notamment en terme de ciblage tissulaire et de régulation de l'expression et

30

- la production en grande quantité des vecteurs contrôlés, standardisés et de qualité optimale, permettant de réaliser des études précliniques et des essais cliniques de phase I.

Dans ce contexte, afin d'analyser rapidement de nombreuses constructions de vecteurs et d'optimiser leur production en grande quantité, il est capital de pouvoir déterminer facilement, rapidement et précisément la concentration desdits vecteurs par des méthodes performantes.

Les méthodes de détermination de la concentration ou du titre desdits vecteurs, en particulier des vecteurs viraux, décrites dans la littérature se divisent en méthodes physiques et en méthodes biologiques.

Les méthodes physiques mesurent le titre en particules physiques (*pp*) (Mittereder et al., J. Virol., 1996, 70, 11, 7498-7509 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823 ; Nelson et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 16, 2401-2405), qui représente le nombre total de particules virales de vecteur ; habituellement ce titre est évalué soit directement par comptage des particules virales en microscopie électronique, soit indirectement par mesure du contenu en acides nucléiques (hybridation ou absorbance des acides nucléiques (DO_{260}) pour AAV et AdV, respectivement), ou en protéines virales (activité RT et contenu en p24, par exemple pour MLV et HIV, respectivement) des vecteurs. La mesure du titre en particules physiques ne reflète pas la quantité de particules infectieuses présentes et biologiquement actives, en raison de la présence de particules défectives (*defective-interfering particles* ou *DI*) non infectieuses, sans génome ou avec un génome incomplet.

Les méthodes biologiques permettent, en revanche, de déterminer un titre en particules infectieuses (*ip* : unités infectieuses, unités formant plaque, unités de transduction) (Mittereder et al., précité ; Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 5, 695-706 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) par la mesure d'un paramètre biologique qui reflète l'activité du vecteur dans des cellules infectées en culture : réplication virale (AAV), intégration du provirus (rétrovirus, HIV), lyse cellulaire (formation de foyers ou de plages de lyse, uniquement dans le cas de virus lytiques (AdV, HSV)) et expression du transgène (tous les types de vecteurs). *ip* mesure le nombre de particules actives dans le processus biologique dont l'effet est mesuré. Ainsi, les préparations de vecteur présentant un titre élevé en particules

infectieuses et un rapport particules physiques/particules infectieuses faible sont considérées comme étant de haute qualité, ces deux paramètres étant considérés comme fournissant une information quantitative concernant la performance d'une préparation d'un vecteur de transfert de gène.

- 5 Quelle que soit la nature du paramètre mesuré, les méthodes décrites reposent essentiellement sur : une dilution en série du vecteur (environ 10 à 20 dilutions en double ou en triple), suivie d'une période d'incubation du vecteur avec les cellules (d'1 à 15 jours), puis du traitement des cellules (lyse, fixation, coloration, addition de substrat, hybridation, PCR), de la mesure du paramètre fonctionnel et
- 10 enfin de la détermination du titre qui correspond à la dilution limite, c'est-à-dire à la dilution la plus élevée pour laquelle la valeur du paramètre biologique mesuré atteint sa limite de détection. Le titre est généralement déterminé à partir de la courbe qui représente les valeurs du paramètre biologique en fonction de la dilution du vecteur : par une extrapolation linéaire à partir de la région centrale quasi-linéaire de la courbe
- 15 suivie de la détermination de l'intersection avec l'axe des abscisses, par une approximation asymptotique de ladite courbe dans la région des dilutions élevées, qui peut-être effectuée à l'aide d'un programme informatique, qui repose sur une fonction hyperbolique pour le calcul du titre. Ainsi, plus le nombre de dilutions testées est élevé, plus la valeur du titre sera précise.
- 20 Cependant ces techniques sont peu fiables et présentent l'inconvénient de ne pas être standardisées. Pour résoudre ce problème, de nouvelles méthodes mieux adaptées à la détermination du titre (ou concentration) et à la comparaison de différents virus recombinants utilisés en thérapie génique ont été proposées (E.M. Atkinson et al, précité; Demande Internationale PCT WO 99/11764).
- 25 Par exemple, dans l'article au nom d'E.M. Atkinson et al., précité et dans la Demande Internationale PCT WO 99/11764, la méthode qui est décrite met en œuvre essentiellement une étape d'amplification du matériel génétique viral dans une lignée cellulaire hôte, des préparations de vecteur standard de titre connu obtenues par dilutions en série et un contrôle interne de titre connu. De manière plus précise, la
- 30 méthode comprend dans différents puits d'une plaque de microtitration, l'infection de cellules à l'aide de dilutions en série d'une préparation virale (10 dilutions en triplicat), la réplication du génome viral dans ladite cellule hôte pendant 48 h à 72 h, la

lyse chimique de ladite cellule, une hybridation de l'acide nucléique puis la mesure de la quantité relative d'acide nucléique viral répliqué dans chaque puits et la détermination du titre par extrapolation linéaire de la courbe, qui représente les valeurs des mesures obtenues en fonction de la dilution du vecteur.

5 Ainsi, les méthodes de l'Art antérieur, même les mieux adaptées comme celles décrites par d'E.M. Atkinson et al., précité, ne répondent pas aux besoins du développement et de la production des vecteurs de transfert de gènes pour les raisons suivantes :

10 - elles sont très lourdes à mettre en œuvre et comprennent de nombreuses manipulations, à chaque étape de la méthode, en raison du nombre important d'échantillons correspondant à chaque dilution de vecteur. Par conséquent, elles ne sont pas utilisables dans le contexte du développement et de la production des vecteurs de transfert de gènes, qui implique le traitement de très nombreux échantillons pour comparer différentes constructions ou conditions de production des vecteurs
15 ou bien pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs,

 - elles ne sont pas standardisées pour la plupart,
 - elles sont difficilement automatisables, étant donné le nombre et la complexité des étapes à mettre en œuvre, et
 - le résultat est obtenu à un temps fixe qui, en fonction de la
20 nature du paramètre mesuré, est de plusieurs jours (expression d'un transgène) à plusieurs semaines (formation de plages de lyse). Ainsi, les délais nécessaires pour la mise en œuvre de ces méthodes ne sont pas adaptés à la détermination rapide de la concentration des vecteurs de transfert de gènes vecteurs , dans le criblage des banques de vecteurs, le contrôle en cours de production ou bien pour suivre la ciné-
25 tique de production de ces vecteurs.

La présente invention s'est en conséquence donnée pour but, de fournir un procédé de détermination du titre d'un agent biologique qui répond mieux au besoin de la pratique, en ce qu'elle permet l'analyse de nombreux échantillons en temps réel.

30 L'invention a également pour objet les applications dudit procédé pour le criblage, l'analyse et la production des vecteurs viraux de transfert de gènes,

des vaccins viraux et des protéines recombinantes ainsi que pour le diagnostic des infections virales.

La présente invention a pour objet un procédé de détermination du titre d'un agent biologique interagissant avec des cellules cibles vivantes, lequel
5 procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(a₁) l'incubation dudit agent biologique à une concentration C initiale inconnue, avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,

(b₁) la mesure à différents temps successifs t , de l'intensité i d'un même signal, qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes,

10 (c₁) la détermination du temps t_β correspondant à la valeur $i = \beta$, choisie dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement, les concentrations minimales et maximales d'un agent biologique de référence, dont la courbe $t_\beta = f(C)$ (courbe de référence), est préétablie et

15 (d₁) la détermination de la concentration C initiale de l'agent biologique, à l'aide de ladite courbe de référence $t_\beta = f(C)$.

Définitions

• on entend par agent biologique : un vecteur de transfert de gènes viral ou non-viral, un virus, un anticorps, un vaccin ou une protéine recombi-
20 nante.

• on entend par cellules cibles vivantes, des cellules cibles, *in vitro* ou *ex vivo*, avant leur modification par un agent biologique.

• on entend par titre C d'un agent biologique, sa concentration en particules ou en molécules actives dans la réaction agent biologique + cellules cibles
25 vivantes (C correspond au titre en particules infectieuses ou ip , tel que défini ci-dessus pour les vecteurs viraux de transfert de gènes).

• on entend par réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, la réponse des cellules cibles à l'agent biologique ou processus biologique, il s'agit notamment de :

- 30
- l'expression d'un gène rapporteur ou d'un transgène,
 - de la réplication, de l'intégration ou de l'activité cytolytique d'un virus,

- d'une activité enzymatique, anti-virale, oncogénique, suppresseur de tumeur, cytotoxique,

- de la prolifération ou de la différenciation cellulaire,
- de la liaison à des anticorps ou à des récepteurs.

5 • Le produit P de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes est mesurable par un signal ; il est déterminé par la mesure d'un paramètre qui reflète la réponse des cellules cibles vivantes à l'agent biologique. De manière non limitative, on peut citer comme mesure : la quantité de protéine ou d'enzyme exprimée par un gène rapporteur ou un transgène, le nombre de copies de génome du
10 vecteur viral, le nombre de cellules.

- on entend par signal, par exemple la fluorescence, la luminescence, l'absorbance ou le dénombrement de cellules. De manière non limitative, on peut citer comme technique de mesure du signal : la microscopie optique ou de fluorescence, la fluorimétrie, la luminométrie et la spectrométrie.

15 • on entend par mesure de l'intensité du signal, la mesure du produit P de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, sans intervention sur les cellules cibles et sur ladite réaction, dont le produit P est mesuré.

- on entend par agent biologique de référence, un agent biologique identique ou similaire à l'agent biologique à analyser, qui présente des modifications qui n'affectent pas son activité dans la réaction dont le produit P est mesuré.

20

- on entend par mesure en temps réel, une mesure dont la valeur est obtenue instantanément.

De manière surprenante, l'Inventeur a montré que l'intensité du signal i qui reflète la réponse des cellules cibles à l'agent biologique dépend uniquement de deux paramètres : la concentration C et le temps t . Ainsi, lorsque t augmente, l'intensité du signal i augmente, proportionnellement à la valeur de C , en conséquence ; pour une valeur de C constante, i varie proportionnellement à t et pour une valeur de t constante, i varie proportionnellement à C .

25

Alors que pour mesurer la concentration C d'un agent biologique, les méthodes de l'Art antérieur utilisent une valeur de t constante, l'Inventeur a
30 trouvé, de manière inattendue que l'utilisation d'une valeur constante de C permet une

détermination plus simple, plus rapide et plus précise de la concentration des agents biologiques.

Ainsi, l'inventeur a montré, de manière surprenante, que la concentration d'un échantillon biologique peut-être déterminée directement, sans avoir
 5 besoin de diluer ledit échantillon ; (1) en mesurant les valeurs de i à différents instants t et en déterminant la valeur t_β correspondant à la valeur $i = \beta$ puis (2) en déterminant la valeur de C correspondant à la valeur t_β , à partir de la courbe de référence $t = f(C)$.

Cette courbe de référence est établie pour une valeur $i = \beta$, comprise dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au
 10 point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement les concentrations minimales et maximales de l'échantillon biologique de référence.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la courbe de référence est établie simultanément ou préalablement à l'étape (a₁), telle que décrite ci-dessus, selon les étapes suivantes :

15 (a₀) la préparation, de n dilutions en série d'un agent biologique de référence de concentration C_0 initiale connue, correspondant respectivement aux concentrations finales C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique,

(b₀) l'incubation de chaque dilution dudit agent biologique de référence obtenue en (a₀) avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,

20 (c₀) la détermination à différents temps successifs t_1 à t_n de l'intensité du signal i qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, pour chaque concentration C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique de référence,

(d₀) le tracé de la courbe $i = f(t)$ pour chaque valeur C_1, C_2, \dots, C_n ,

25 (e₀) la détermination de la valeur β de i , telle que $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ et β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement C_n et C_1 ,

(f₀) le tracé de la courbe de référence $t_\beta = f(C)$ pour la valeur $i = \beta$.

Le procédé de l'invention est parfaitement adapté à l'analyse de nombreux
 30 échantillons en temps réel car il présente les caractéristiques suivantes :

- il est simple,
- il est rapide,

- il est précis,
- il est standardisé et
- il est automatisable.

En effet, le procédé de l'invention ne nécessite pas la dilution des échantillons par conséquent il est particulièrement adapté à l'analyse de nombreux échantillons comme une banque de vecteurs de transfert de gènes. Par exemple, alors que pour déterminer le titre de 30 échantillons de vecteurs, les techniques de l'art antérieur nécessitent, la réalisation de 10 à 20 dilutions et donc la manipulation de 300 à 600 échantillons de cellules à chaque étape de la technique (infection, lyse, fixation, coloration, addition de substrat, hybridation), ce qui implique 1800 à 2400 manipulations pour une technique comprenant 3 étapes (infection, lyse ou fixation et coloration ou addition de substrat), le procédé de l'invention ne nécessite pas de dilution de l'échantillon, ni de manipulation des cellules et implique simplement 30 mesures du signal *i*. Par conséquent, contrairement, aux techniques de l'art antérieur, le procédé de l'invention est simple, parfaitement standardisé et automatisable.

Le procédé de l'invention est plus précis que les techniques de l'art antérieur car dans ledit procédé les mesures sont effectuées à partir d'un même échantillon, pris à différents instants *t*, alors que dans les techniques de l'art antérieur les différentes dilutions de l'échantillon sont testées de façon indépendante, ce qui introduit des variations internes entre ces différentes dilutions.

Le procédé de l'invention qui utilise le temps comme paramètre variable, contrairement aux techniques de l'art antérieur, qui utilisent la concentration *C* comme paramètre variable, permet de déterminer la concentration des agents biologiques en temps réel en mesurant le signal *i* par des techniques comme la fluorimétrie, la luminométrie ou la spectrométrie, ce qui présente de nombreux avantages.

En effet, dans le procédé de l'invention, les valeurs expérimentales sont disponibles immédiatement ce qui permet d'avoir une estimation rapide de la concentration des vecteurs pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs ou bien pour analyser rapidement une banque de vecteurs de transfert de gènes. En revanche, les techniques de l'art antérieur ne permettent pas de telles estimations étant donné qu'aucun résultat intermédiaire, en cours de test n'est disponible ; seul le résultat final est disponible, une fois que l'ensemble des données correspondant aux

différentes dilutions ont été obtenues à l'instant t puis analysées, ce qui correspond à un délai de plusieurs jours à plusieurs semaines, en fonction de la technique utilisée.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit signal est sélectionné dans le groupe constitué par la fluorescence, la luminescence, l'absorbance ou le dénombrement de cellules.

De manière non-limitative, le signal est avantageusement mesuré par une technique telle que : la microscopie optique ou de fluorescence, la fluorimétrie, la luminométrie et la spectrométrie.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

La présente invention a également pour objet un kit ou une trousse de dosage (titrage) ou de détection d'un agent biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des cellules cibles vivantes à une concentration D constante,
- un agent biologique de référence de concentration C connue,
- la courbe de référence dudit agent biologique $t_p = f(C)$ et
- le moyen physique de mesurer l'intensité du signal de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes.

Cette trousse de dosage qui permet des mesures en temps réel, est particulièrement adaptée, notamment à la détermination du titre (titrage) d'un vecteur utilisé en thérapie génique, d'un virus utilisé pour la production d'un vaccin, d'une protéine recombinante utilisée pour la production d'un produit biologique (médicament, réactif) ou bien au dosage et/ou à la détection d'un virus, pour le diagnostic d'une infection virale.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente les valeurs expérimentales de l'intensité du signal de fluorescence i , en fonction du temps t pour chaque concentration (conc.)

d'un vecteur rétroviral codant la protéine fluorescente (EGFP). Les concentrations sont exprimées pour 10^6 particules infectieuses /ml.

- la figure 2 représente les courbes $i = f(t)$, déterminées à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 1.
- 5 - la figure 3 représente les valeurs t_β pour les différentes concentrations de vecteur, déterminées à partir de la courbe de la figure 2, pour la valeur $\beta = 100$ de i .
- la figure 4 représente la courbe de référence du vecteur rétroviral $t_\beta = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 3.
- 10 - la figure 5 représente les valeurs expérimentales de l'intensité du signal d'hybridation i , en fonction du temps t , pour chaque dilution d'un vecteur associé à l'adénovirus recombinant (AAVr).
- la figure 6 représente les courbes $i = f(t)$, déterminées à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 5.
- 15 - la figure 7 représente les valeurs t_β pour les différentes concentrations de vecteur, déterminées à partir de la courbe de la figure 6, pour la valeur $\beta = -2$ de i .
- la figure 8 représente la courbe de référence du vecteur AAVr, $t_\beta = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 7.

20 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Détermination du titre d'un vecteur rétroviral dans des cellules Rat-2.

25 **1.1-Matériels et méthodes**

L'agent biologique analysé est un vecteur rétroviral dénommé (pSI-EGFP ; Ropp et al., Cytometry, 1995, 21, 309-317), codant le gène rapporteur de la protéine fluorescente eucaryote (*Eukaryotic Green Fluorescent Protein* ou EGFP), les cellules cibles sont les cellules Rat-2 (ATCC) la réaction agent biologique + cellules
30 cibles vivantes est l'expression du gène rapporteur EGFP. Le produit P qui est mesuré pour déterminer le titre dudit vecteur (concentration en particules rétrovirales infectieuses ou ip) est la quantité de protéine EGFP, qui est mesurée par fluorimétrie.

Des cellules Rat-2 sont ensemencées dans les puits d'une plaque de microtitration à une concentration constante, puis infectées à $t = 0$, avec les dilutions 1/2, 1/4 et 1/10 d'une préparation de vecteur rétroviral de référence de concentration initiale connue ($C_0 = 10^6$ particules infectieuses /ml), correspondant respectivement
 5 aux concentrations de $0,5 \cdot 10^6$; $0,25 \cdot 10^6$ et $0,1 \cdot 10^6$ particules infectieuses/ml. Aux différents instants, $t = 16$ h, 24 h, 40 h, 48 h et 64 h, l'intensité du signal de fluorescence i , émis par les cellules infectées par chaque dilution de vecteur est mesuré par fluorimétrie. La courbe $i = f(t)$ est ensuite tracée pour chaque dilution et la valeur β est fixée à 100. Les valeurs t_β , correspondant aux valeurs de t lorsque $i = 100$,
 10 sont déterminées pour chaque concentration d'échantillon de référence, puis, la courbe $t_\beta = f(C)$ est tracée à partir de ces valeurs.

1.2-Résultats

La figure 2 représente la courbe $i = f(t)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 1. La figure 4 représente la courbe de
 15 référence du vecteur rétroviral, $t_\beta = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 3.

La figure 2 montre que l'intensité du signal est une fonction du temps t d'incubation du vecteur avec les cellules cibles et de la concentration C dudit vecteur.

20 La figure 2 montre également que la valeur $\beta = 100$, permet une détermination sensible et précise de la concentration du vecteur car elle détecte de faibles concentrations de vecteur et pour cette valeur, les variations de C correspondent à une variation importante de t . Ces résultats sont confirmés par la figure 4 qui représente la courbe de référence du vecteur, $t_\beta = f(C)$. Cette courbe de référence
 25 montre qu'il existe une relation directe entre les valeur de t_β et de C qui permet de déterminer la concentration d'une préparation de vecteur, sans dilution et sans manipulation des cellules, simplement par détermination de la valeur expérimentale t_β de ce vecteur, correspondant à la valeur de $\beta = 100$.

EXEMPLE 2 : Comparaison du titre d'un vecteur associé à l'adénovirus
 30 **recombinant (AAVr) déterminé à l'aide des paramètres d'un procédé classique**

(temps constant et concentration variable) ou du procédé de l'invention (temps variable et concentration constante).

2.1-Matériels et méthodes

L'agent biologique analysé est un virus associé à l'adénovirus, recombina-
 5 tant (AAVr), codant le gène rapporteur lacZ, les cellules cibles sont la lignée Hela-repcap32, la réaction agent biologique + cellules cible vivantes est la réplication virale et le produit P qui est mesuré pour déterminer le titre du vecteur (concentration en particules actives ou ip) est le nombre de copies de génome de AAVr. P est mesuré par hybridation de type Dot-blot selon les techniques classiques connues de
 10 l'Homme du métier.

Les cellules Hela-repcap32 sontensemencées dans les puits d'une plaque de microtitration à une concentration constante, puis co-infectées, à $t = 0$, avec les dilutions 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9} du vecteur et l'adénovirus sauvage, à une multipli-
 cité d'infection de 100.

15 Aux différents instants, $t = 6$ h, 14 h, 18 h, 20 h, 24 h, 30 h, 38 h, 44 h, 48 h et 54 h, les cellules sont récoltées puis le génome viral est isolé et hybridé avec une sonde nucléotidique spécifique marquée, selon la technique du Dot Blot classiquement utilisée par l'homme du métier. L'intensité du signal, qui représente la quantité d'ADN hybridée est mesuré à l'aide d'un phosphorimageur.

20 Pour la détermination du titre par le procédé classique, la courbe $\log i = f(\log \text{dilution})$ est tracée à partir des valeurs obtenues au temps $t = 24$ h et le titre est déterminé par approximation asymptotique dans la région des plus fortes dilutions.

Pour la détermination du titre par le procédé de l'invention, la courbe $\log i = f(t)$ est tracée pour chaque dilution de vecteur et la valeur β est fixée à -
 25 2. Les valeurs t_β , correspondant aux valeurs de t lorsque $i = -2$, sont déterminées pour chaque concentration de l'agent de référence, puis, la courbe $t_\beta = f(\log C)$ est tracée à partir de ces valeurs.

2.2-Résultats

La figure 6 représente la courbe $\log i = f(t)$, déterminée à partir des
 30 valeurs expérimentales présentées à la figure 5. La figure 8 représente la courbe de référence du vecteur AAVr, $t_\beta = f(\log C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 7.

La figure 6 montre que l'intensité du signal est une fonction du temps t d'incubation du vecteur avec les cellules cibles et de la concentration C dudit vecteur.

La figure 6 montre également que la valeur $\beta = -2$, permet une détermination sensible et précise de la concentration du vecteur, car elle détecte de faibles concentrations de vecteur et pour cette valeur, les variations de C correspondent à une variation importante de t .

Ces résultats sont confirmés par la figure 8 qui représente la courbe de référence du vecteur, $t_\beta = f(\log C)$. Cette courbe de référence montre qu'il existe une relation directe entre les valeurs de t_β et de C qui permet de déterminer, avec précision et sans dilution, la concentration d'une préparation de vecteur, à partir d'une seule valeur expérimentale t_β de ce vecteur correspondant à la valeur de $\beta = -2$.

A titre comparatif, pour une même préparation de vecteur, le procédé classique donne un titre de 1×10^8 particules infectieuses/ml et le procédé de l'invention donne un titre de $0,85 \times 10^8$ particules infectieuses/ml. Ces résultats montrent que les valeurs obtenues par le procédé de l'invention sont comparables à celles obtenus par les procédés classiques de titrage d'agents biologiques. Néanmoins, contrairement aux procédés classiques le procédé de détermination du titre d'agent biologiques de l'invention permet avantageusement d'analyser de nombreux échantillons, simultanément et en temps réel. En effet, il est simple, rapide, précis, standardisé, automatisable et la valeur de l'intensité du signal qui mesure le produit de la réaction de l'agent biologique avec les cellules cibles vivantes est obtenue instantanément, sans intervention sur les cellules cibles et sur la réaction biologique dont le produit est mesuré.

Ainsi, le procédé de l'invention est utilisable aussi bien pour :

- cribler rapidement une banque de vecteurs de transfert de gènes ou de mutants d'une protéine recombinante ,
- optimiser ou contrôler la production : des vecteurs de transfert de gènes thérapeutiques utilisables pour des essais précliniques et des essais cliniques de phase I, des virus utilisés comme vaccins viraux ou des protéines recombinantes utilisées comme médicament ou comme réactif biologique et

- détecter rapidement une infection virale à partir d'un échantillon biologique d'un patient à tester.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui
5 viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Procédé de détermination du titre d'un agent biologique interagissant avec des cellules cibles vivantes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- 5 (a₁) l'incubation dudit agent biologique à une concentration C initiale inconnue, avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
- (b₁) la mesure à différents temps successifs t , de l'intensité i d'un même signal, qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes,
- (c₁) la détermination du temps t_β correspondant à la valeur $i = \beta$,
- 10 choisie dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement les concentrations minimales et maximales d'un agent biologique de référence dont la courbe $t_\beta = f(C)$ est préétablie et
- (d₁) la détermination de la concentration C initiale de l'agent biologique,
- 15 à l'aide de ladite courbe de référence $t_\beta = f(C)$.

2°) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que simultanément ou préalablement à l'étape (a₁), ladite courbe de référence est établie selon les étapes suivantes :

- (a₀) la préparation, de n dilutions en série d'un agent biologique de
- 20 référence de concentration C_0 initiale connue, correspondant respectivement aux concentrations finales C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique,
- (b₀) l'incubation de chaque dilution dudit agent biologique de référence obtenue en a₀ avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
- (c₀) la détermination à différents temps successifs t_1 à t_n de
- 25 l'intensité du signal i qui résulte de la réaction agent biologique+ cellules cibles vivantes, pour chaque concentration C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique de référence,
- (d₀) le tracé de la courbe $i = f(t)$ pour chaque valeur C_1, C_2, \dots, C_n ,
- (e₀) la détermination de la valeur β de i , telle que $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ et
- 30 β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement C_n et C_1 ,
- (f₀) le tracé de la courbe de référence $t_\beta = f(C)$ pour la valeur $i = \beta$

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

5 (4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit signal est sélectionné dans le groupe constitué par la fluorescence, la luminescence, l'absorbance et le dénombrement de cellules.

(5°) Trousse de dosage ou de détection d'un agent biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 10
- des cellules cibles vivantes à une concentration D constante,
 - un agent biologique de référence de concentration C connue,
 - la courbe de référence dudit agent biologique $t_p = f(C)$ et
 - le moyen physique de mesurer l'intensité du signal de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2808804

N° d'enregistrement
nationalFA 591068
FR 0005852

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 * page 363; figure 3 *	1-5	G01N33/53 C12Q1/68
A	SCHUHMANN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, novembre 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 * abrégé *	1-5	
A	MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOËBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 * page 199; figure 4 *	1-5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) G01N C12Q
A	DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 * le document en entier *	1-5	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 mars 2001		Griffith, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

2

EPO FORM 1503 12/99 (P4/C14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2808804

N° d'enregistrement
nationalFA 591068
FR 0005852

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	WO 99 11764 A (TARGETED GENETICS CORPORATION) 11 mars 1999 (1999-03-11) * exemple 4 *	1-5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
D,A	ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 * le document en entier *	1-5	
D,A	NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 novembre 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 * le document en entier *	1-5	
D,A	MITTEREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 * le document en entier *	1-5	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 mars 2001		Griffith, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2808804

N° d'enregistrement
national

FA 591068
FR 0005852

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	<p>SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP000946374 ISSN: 1043-0342 * page 697, colonne 2, alinéa 2 - page 699, colonne 1, alinéa 1 *</p> <p>-----</p>	1-5	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 mars 2001		Griffith, G	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P/MC14)